

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_ 密级\_\_\_\_\_

学 号: 21720080150430

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

四种纳米探针的设计及其在生物检测中的应用

Development of four kinds of nanoprobe and their use  
in biological detection

夏晓虎

指导教师姓名: 李庆阁 教 授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 10 月

论文答辩时间: 2011 年 11 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2011 年 11 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（     ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于     年   月   日解密，解密后适用上述授权。

（     ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年   月   日

# 中文目录

摘要.....	1
Abstract.....	2
<b>第一章 绪论.....</b>	<b>3</b>
1.1 纳米检测探针概述.....	3
1.2 几种纳米探针应用于生物检测中的研究背景 .....	4
1.2.1 基于增强拉曼探针的生物检测技术.....	5
1.2.2 基于金纳米材料的光学成像技术.....	8
1.2.3 基于纳米标记探针的免疫层析技术.....	10
1.2.4 基于纳米放大系统的酶联免疫吸附分析技术.....	11
1.3 本论文的设计思路及创新点.....	13
参考文献 .....	15
<b>第二章 银二聚球拉曼探针的制备及其在检测肿瘤细胞中的应用.....</b>	<b>23</b>
<b>第一节 引言.....</b>	<b>23</b>
2.1.1 研究背景.....	23
2.1.2 设计思路.....	25
<b>第二节 材料与方法 .....</b>	<b>26</b>
2.2.1 实验材料.....	26
2.2.2 仪器.....	26
2.2.3 银纳米颗粒的制备.....	27
2.2.4 纳米颗粒的拉曼分子标记以及二氧化硅包裹.....	28
2.2.5 抗体标记.....	28
2.2.6 细胞培养与标记.....	29
2.2.7 增强拉曼信号的采集.....	29
<b>第三节 实验结果 .....</b>	<b>31</b>
2.3.1 银纳米颗粒的制备.....	31
2.3.2 银纳米颗粒的二氧化硅包裹.....	34
2.3.3 银拉曼探针的增强拉曼性能.....	37
2.3.4 银拉曼探针在检测肿瘤细胞中的应用.....	43
2.3.5 银纳米二聚球拉曼探针的多重标记性能.....	46
<b>第四节 讨论.....</b>	<b>47</b>
参考文献 .....	49
<b>第三章 金纳米笼酶活探针的设计及其应用于检测MMP-2 酶.....</b>	<b>52</b>
<b>第一节 引言.....</b>	<b>52</b>
3.1.1 研究背景.....	52
3.1.2 设计思路.....	52
<b>第二节 材料与方法 .....</b>	<b>54</b>

3.2.1 实验材料.....	54
3.2.2 仪器.....	54
3.2.3 金纳米笼的制备.....	55
3.2.4 金纳米笼酶活检测探针的制备.....	56
3.2.5 金纳米笼酶活检测探针表面多肽个数定量.....	56
3.2.6 金纳米笼酶活检测探针用于检测MMP-2 酶.....	57
3.2.7 抑制剂的抑制实验.....	57
3.2.8 模拟显像实验.....	57
<b>第三节 实验结果 .....</b>	<b>58</b>
3.3.1 银纳米方块 (Ag nanocube) 的制备.....	58
3.3.2 金纳米笼 (Au nanocage) 的制备 .....	59
3.3.3 金纳米笼酶活检测探针表面多肽个数的计算.....	61
3.3.4 金纳米笼酶活检测探针检测MMP-2 的酶可行性实验.....	62
3.3.5 金纳米笼酶活检测探针检测 MMP-2 酶性能考察.....	63
3.3.6 模拟显像.....	65
3.3.7 荧光染料的多重选择性.....	66
<b>第四节 讨论.....</b>	<b>68</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>70</b>
 <b>第四章 稀土荧光纳米标记探针在免疫层析检测技术中的应用 .....</b>	 <b>74</b>
<b>第一节 引言.....</b>	<b>74</b>
4.1.1 研究背景.....	74
4.1.2 设计思路.....	75
<b>第二节 材料与方法 .....</b>	<b>76</b>
4.2.1 实验材料与仪器.....	76
4.2.2 稀土荧光纳米颗粒的制备.....	76
4.2.3 稀土荧光纳米标记探针的制备（抗体的定向标记） .....	78
4.2.4 CAP全抗原的合成及全抗原上CAP个数和氨基个数的估算.....	79
4.2.5 抗氯霉素多克隆抗体的制备及纯化.....	80
4.2.6 免疫层析试纸条的装配.....	80
4.2.7 样品的检测.....	81
<b>第三节 实验结果 .....</b>	<b>83</b>
4.3.1 Eu(III)-BHHCT荧光纳米颗粒的制备与表征.....	83
4.3.2 氯霉素(CAP)全抗原和抗体的制备 .....	85
4.3.3 层析纸条材料的选择.....	89
4.3.4 HBsAg免疫层析检测.....	89
4.3.5 CAP免疫层析检测.....	94
<b>第四节 讨论.....</b>	<b>97</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>99</b>
 <b>第五章 HRP-SiO<sub>2</sub>纳米探针的制备及其在酶联免疫分析中的应用 .....</b>	 <b>103</b>
<b>第一节 引言.....</b>	<b>103</b>
5.1.1 研究背景.....	103

5.1.2 设计思路.....	104
<b>第二节 材料与方法 .....</b>	<b>105</b>
5.2.1 材料.....	105
5.2.2 仪器.....	105
5.2.3 SiO <sub>2</sub> 纳米颗粒表面氨基修饰 .....	105
5.2.4 HRP和葡聚糖的氧化.....	106
5.2.5 HRP-SiO <sub>2</sub> 纳米颗粒的制备 .....	106
5.2.6 抗体修饰HRP-SiO <sub>2</sub> 纳米颗粒（标记探针） .....	107
5.2.7 基于HRP-SiO <sub>2</sub> 纳米标记探针的ELISA“夹心法”检测HBsAg .....	108
5.2.8 基于HRP-SiO <sub>2</sub> 纳米标记探针的ELISA“竞争法”检测CAP .....	108
<b>第三节 实验结果 .....</b>	<b>112</b>
5.3.1 氨基硅烷链长度对HRP标记效率的影响.....	112
5.3.2 “夹心法”检测HBsAg.....	113
5.3.3 “竞争法”检测CAP .....	115
<b>第四节 讨论.....</b>	<b>119</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>121</b>
<b>英文缩写索引.....</b>	<b>125</b>
<b>博士期间发表交流论文.....</b>	<b>126</b>
<b>致谢.....</b>	<b>127</b>

# TABLE OF CONTENTS

<b>Abstract (in Chinese)</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract (in English)</b> .....	<b>2</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Research background of nanoprobe</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Representative nanoprobe in biodetection</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 SERS-based probe for biodetection .....	5
1.2.2 Gold nanomaterial-based probe .....	8
1.2.3 Nanoprobe-based lateral flow assay .....	10
1.2.4 Nanoprobe-based ELISA .....	11
<b>1.3 Motivation of theses</b> .....	<b>13</b>
<b>References</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapter 2 Ag dimer-SERS probe and its use in biodetection</b> .....	<b>23</b>
<b>Part I Introduction</b> .....	<b>23</b>
2.1.1 Research Background .....	23
2.1.2 Design .....	25
<b>Part II Materials and methods</b> .....	<b>26</b>
2.2.1 Chemicals .....	26
2.2.2 Instrumentation .....	26
2.2.3 Preparation of silver nanoparticles .....	27
2.2.4 Preparation of SERS probe .....	28
2.2.5 Conjugation of antibodies .....	28
2.2.6 Cell culture and labeling .....	29
2.2.7 SERS measurements .....	29
<b>Part III Results</b> .....	<b>31</b>
2.3.1 Preparation of Ag nanoparticles .....	31
2.3.2 Silica coating of Ag particles .....	34
2.3.3 Properties of SERS probes .....	37
2.3.4 Detection of cancer cell using SERS probes .....	43
2.3.5 Multiple labeling ability of the Ag dimer-probe .....	46
<b>Part IV Discussion</b> .....	<b>47</b>
<b>References</b> .....	<b>49</b>
<b>Chapter 3 Au cage-based enzyme detection probe</b> .....	<b>52</b>
<b>Part I Introduction</b> .....	<b>52</b>
3.1.1 Research Background .....	52
3.1.2 Design .....	52
<b>Part II Materials and methods</b> .....	<b>54</b>
3.2.1 Chemicals .....	54
3.2.2 Instrumentation .....	54
3.2.3 Preparation of Au cage .....	55

3.2.4 Preparation of Au cage-enzyme sensitive probe.....	56
3.2.5 Quantification of the number of peptides .....	56
3.2.6 Detection of MMP-2 using Au cage-enzyme sensitive probe .....	57
3.2.7 Inhibition test .....	57
3.2.8 Imaging .....	57
<b>Part III Results.....</b>	<b>58</b>
3.3.1 Preparation of Ag nanocube.....	58
3.3.2 Preparation of Au cage.....	59
3.3.3 Quantification of the number of peptides per probe .....	61
3.3.4 Detection of MMP-2 .....	62
3.3.5 Properties of the Au cage-based detection probe.....	63
3.3.6 Imaging results.....	65
3.3.7 Multiple labeling ability of the probe .....	66
<b>Part IV Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>References .....</b>	<b>70</b>
 <b>Chapter 4 Eu-silica particle based lateral flow assay .....</b>	 <b>74</b>
<b>Part I Introduction.....</b>	<b>74</b>
4.1.1 Research Background .....	74
4.1.2 Design .....	75
<b>Part II Materials and methods .....</b>	<b>76</b>
4.2.1 Chemicals and instrumentation.....	76
4.2.2 Preparation of fluorescent particles .....	76
4.2.3 Conjugation of antibodies .....	78
4.2.4 Preparation of CAP antigen .....	79
4.2.5 Preparation of anti-CAP polyclonal antibodies .....	80
4.2.6 Preparation of test strips.....	80
4.2.7 Sample detection .....	81
<b>Part III Results.....</b>	<b>83</b>
4.3.1 Eu(III)-BHHCT loaded silica particles .....	83
4.3.2 Antigens and antibodies of CAP .....	85
4.3.3 Optimization of test strip .....	89
4.3.4 Detection of HBsAg.....	89
4.3.5 Detection of CAP .....	94
<b>Part IV Discussion .....</b>	<b>97</b>
<b>References .....</b>	<b>99</b>
 <b>Chapter 5 A new kind ELISA using HRP-SiO<sub>2</sub> as probe .....</b>	 <b>103</b>
<b>Part I Introduction.....</b>	<b>103</b>
5.1.1 Research Background .....	103
5.1.2 Design .....	104
<b>Part II Materials and methods .....</b>	<b>105</b>
5.2.1 Chemicals.....	105
5.2.2 Instrumentation .....	105
5.2.3 Amination of SiO <sub>2</sub> .....	105
5.2.4 Oxidation of HRP and Dextran.....	106
5.2.5 Preparation of HRP-SiO <sub>2</sub> .....	106



5.2.6 Antibody conjugation of HRP-SiO <sub>2</sub> particles .....	107
5.2.7 Detection of HBsAg using the HRP-SiO <sub>2</sub> based ELISA .....	108
5.2.8 Detection of CAP using the HRP-SiO <sub>2</sub> based ELISA .....	108
<b>Part III Results .....</b>	<b>112</b>
5.3.1 Chain length of amino silane .....	112
5.3.2 Detection of HBsAg.....	113
5.3.3 Detection of CAP .....	115
<b>Part IV Discussion .....</b>	<b>119</b>
<b>References .....</b>	<b>121</b>
<b>List of Abbreviations.....</b>	<b>125</b>
<b>Publicatoin.....</b>	<b>126</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>127</b>

## 摘要

本文集中阐述了四种纳米检测探针的设计及其在生物检测中的应用。通过对纳米颗粒的精妙设计以及对其表面进一步的生物分子修饰，达到了将它们作为高灵敏检测探针，成功应用于检测肿瘤标记物、酶活性、农药残留等的目的。

全文共分为五部分：（一）绪论。对纳米检测探针及其生物应用背景做了简单介绍，最后提出本论文设计思路及创新点。（二）银纳米二聚球增强拉曼探针的设计及应用。该设计特别之处在于使用了含更强“拉曼增强热点”的银纳米二聚球作为增强拉曼探针。通过对肿瘤标志物HER2 的检测，证明了银纳米二聚球增强拉曼探针比传统的以单个银纳米球为检测探针的灵敏度高 5-8 倍。

（三）金纳米笼酶活检测探针的设计及应用。该设计将标记荧光的酶特异识别多肽交联于金纳米笼表面，当酶存在时，会切断多肽使荧光基团释放出纳米笼表面而产生荧光信号。设计中，通过调节纳米笼吸收光谱，使之不与荧光光谱重叠，从而达到减少金属干扰、实现检测信号最大化的目的。以MMP-2 酶作为检测对象，灵敏度可达 0.72ng/mL。（四）稀土荧光纳米标记探针在免疫层析中的应用。使用层层修饰的高亮度稀土荧光颗粒作为标记探针，大幅提高了免疫层析检测灵敏度。以乙肝表面抗原作为检测对象，证明了该新型层析纸条检测灵敏度可达 0.03 ug/L，比传统的胶体金纸条高 100 倍，该方法成功检测了 286 份临床血清样本。该技术也成功应用于对小分子氯霉素残留的检测。

（五）HRP-SiO<sub>2</sub>纳米标记探针的制备及其在酶联免疫吸附检测中的应用。通过将大量的辣根过氧化物酶（HRP）分子标记于SiO<sub>2</sub>颗粒表面，从而达到了检测信号的放大。实验证明其检测乙肝表面抗原的灵敏度达 0.06ng/mL，线性范围 0.15-12.5 ng/mL；对氯霉素检测灵敏度可以达 0.012ng/mL，线性良好。

综上所述，本论文提出了四种新型纳米检测探针的制备方法及其在生物检测中的应用。实验证明，所设计的几类检测探针均比传统的相关检测手段具有更灵敏、更方便等优点。因此，本论文所提出的纳米检测探针具有较高的理论研究意义及潜在的临床应用价值。

**关键词：** 纳米材料；检测探针；荧光；增强拉曼；免疫分析

## Abstract

This dissertation focuses on the development of four kinds of nanomaterial based detection probes. The scope of such detection probes refers to the area of fluorescence, surface-enhanced Raman scattering (SERS), and optics. The dissertation described the design and application of these detection probes.

The dissertation can be divided into five chapters. Specifically, *chapter 1* reviewed current nanomaterial based detection probes, and relative newly developed techniques. At the end, motivation and design of the dissertation were addressed. In *chapter 2*, dimmers of Ag nanospheres were employed as SERS tags to detect cancer biomarker. The detection limit of such SERS tag was 5-8 times lower than the conventional tags using single nanospheres. In *chapter 3*, gold nanocages based enzyme-sensitive probe for detection of protease activity was discussed. The detection sensitivity could be maximized by using gold nanocages with a localized surface plasmon resonance peak away from the emission peak of the dye. Setting MMP-2 as a model target, the detection limit could reach 0.72 ng/mL. In *chapter 4*, Europium chelates loaded silica nanoparticles were used as probes in lateral flow immunoassay (LFIA). The new LFIA was validated by detecting hepatitis B surface antigen (HBsAg) and chloramphenicol (CAP). The detection limits for HBsAg and CAP was determined to be 34.5pg/mL and 0.1ng/mL, respectively, which were more sensitive than other FLIAs reported. *Chapter 5* is “preparation of HRP-SiO<sub>2</sub> nanoparticle and their use in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)”. The probe was prepared through layer-by-layer immobilization of enzyme and antibody on a silica nanoparticle scaffold, which provided a much higher signal and increased sensitivity. The detection limit for HBsAg was three times lower than that of the commercially available ELISA kit. CAP was also successfully detected, as the example of competitive ELISA mode with high sensitivity.

In conclusion, four kinds of detection probes were rationally designed and used in detection of the standard solution and real samples. Considering their high sensitivity, rapid running, and easy-to-use, it is expected that such novel detection probes presented here may serve as promising candidates for both analytical and biomedical detection.

**Key words:** nanomaterial; detection probe; fluorescence; SERS; immunoassay

## 第一章 绪论

### 1.1 纳米检测探针概述

纳米材料一般指的是尺寸在 1-100 nm 之间大小的粒子组成的材料<sup>[1]</sup>。纳米材料具有明显不同于其他材料的独特性质，如表面效应、体积效应、量子尺寸效应和宏观隧道效应等<sup>[2-5]</sup>。自 1984 年德国科学家 Gleiter 等<sup>[6]</sup>人首次用惰性气体凝聚法成功地制得铁纳米微粒以来，它便引起了世界各国科学工作者的浓厚兴趣，如今纳米材料已经在光学、化工、陶瓷、生物和医药等诸多方面的体现出其重要的应用价值<sup>[7-9]</sup>。近十多年来，关于纳米材料的合成、应用等各方面的研究，都已取得了丰硕的成果。然而对纳米材料的研究工作还远没有结束，特别是在上述的应用方面依然有着十分广阔的未知领域，吸引着很多科研人员的研究兴趣。

纳米材料的应用非常广泛。其中，将它们作为检测探针<sup>[10,11]</sup>，其应用于生物检测<sup>[12-16]</sup>方面的优势尤为突出，并日益成为更多研究者的努力方向。纳米检测探针的检测性能一般依赖于两方面：纳米材料本身所能提供的检测信号、纳米材料的表面修饰途径。前者是根据纳米材料本身固有的性质，提供不同类型的检测信号。因此，根据不同的纳米探针，有不同的检测技术。因此，相应的纳米检测探针种类繁多，从功能上大致可分为以光、热、磁、电等作为检测信号的纳米探针。后者则是通过生物分子等修饰，使得纳米探针具有靶向性，即提供了纳米检测探针的检测特异性。

纳米材料应用于生物检测中具有几大优点：1) 容易合成。如金属材料等在化学合成已较为成熟，而且材料的形貌、组成材料等控制已经研究得较为清楚。2) 方便的表面修饰。纳米功能材料很容易通过化学物理手段在其表面修饰官能团，如引入  $-COOH$ ， $-NH_2$  等基团，为随后的靶向分子，如 DNA、抗体等的修饰提供了方便的标记途径。3) 合适的尺寸。生物细胞的尺寸一般在几微米到几十微米，它们可以通过细胞膜吞噬 (up-take) 1-100 nm 尺寸的纳米材料。4) 生物兼容性较好。许多纳米材料，如金纳米颗粒、高分子纳米材料等，已被研究证明其生物毒害作用较小<sup>[17-20]</sup>。

## 1.2 几种纳米探针应用于生物检测中的研究背景

本论文的研究内容主要围绕“对四种生物检测技术中的纳米探针作技术上的改进”，这四种生物检测技术包括：基于增强拉曼探针的生物检测技术、基于金纳米材料的光学成像技术、基于纳米标记探针的免疫层析技术、及基于纳米放大系统的酶联免疫分析技术。因此，笔者首先对纳米检测探针在这几个生物检测领域的研究背景作简单的介绍，最后再提出本论文的研究设计以及创新点。

### 1.2.1. 基于增强拉曼探针的生物检测技术

拉曼光散射 (Raman scattering) <sup>[21, 22]</sup> 的发现是印度科学家C.V. 拉曼 (Raman) 在 1928 年首次发现的，随后他也因此获得了 1930 年的诺贝尔奖。光照射到介质的时候，除了介质吸收、反射和透过外，有一部分被散射。其中，波数变化大于  $1\text{ cm}^{-1}$  的散射，相当于分子转动、振动能级和电子能级间跃迁范围，称为拉曼散射。拉曼散射出的信号是介质/分子的特定振动信号，因此拉曼光谱可以用来检测和鉴定特定物质。但是由于拉曼散射的信号及其弱，仅相当于入射光强度的  $10^{-10}$ ，<sup>[23, 24]</sup> 因此检测信号特别微弱，这也大大限制了其应用。直到 1974 年，Fleishmann 等<sup>[25]</sup> 人发现，对光滑银电极表面进行粗糙化处理后，可以获得吸附在银电极表面上单分子层吡啶分子的高质量的拉曼光谱。随后 Van Duyne<sup>[26]</sup> 及 Creighton<sup>[27]</sup> 等通过系统的实验和计算发现吸附在粗糙银表面上的每个吡啶分子的拉曼散射信号与溶液相中的吡啶的拉曼散射信号相比，增强了约  $10^6$  个数量级，并提出这是一种与粗糙表面相关的表面增强效应，即所谓的表面增强拉曼散射 (surface-enhanced Raman scattering, 简称SERS) 效应。这一结果立即在物理、化学、表面界面等研究领域引起轰动。后来，研究人员发现，当分子吸附在金属纳米材料 (主要是Ag, Au, Cu) 表面时，其拉曼信号能得到大幅度提高，特别地，当拉曼活性分子吸附在聚集的纳米颗粒缝隙间，其拉曼信号的增强可达到  $10^{14}$ ，该增强倍数可以达到对单分子的检测<sup>[28]</sup>。一时间，关于SERS的研究成了科学界一大热门，其研究分为两个主要方向：机理研究和检测应用。关于SERS的机制，经过研究，人们提出了十几种理论模型，目前较普遍的观点是SERS活性的表面往往能产生被增强的局域电场，是金属表面等离子共振振荡引起的，这被称为物理增强<sup>[29]</sup>。而分子在金属上的吸附

常伴随着电荷的转移引起分子能级的变化，或分子吸附在特别金属表面结构点上也导致增强，这两种情况均被称为化学增强<sup>[30]</sup>。

关于SERS 的应用也在分析化学、生物检测等领域掀起了研究热潮。在生物检测中，SERS的应用主要分为两大类型，即直接检测和间接检测。直接法是将待检测的样品与金属纳米材料（即拉曼活性基底，Raman active substrate）直接接触，通过基底增强待检测样品的特异拉曼信号来检测样品。该方法是最早的检测方法。例如Van Duyne等<sup>[31]</sup>人用粗糙的银纳米膜检测葡萄糖（Glucose）浓度，其检测范围为 0-250 mM。此后，用SERS直接检测肿瘤标记物蛋白、DNA序列等的报道层出不穷<sup>[32-34]</sup>。用直接法检测的优点在于检测方便直接，然而，由于拉曼检测的高灵敏性，导致直接检测法的检测信号受到背景噪音的影响较为严重。由于待检测样品中往往含有大量待检测分子以外的物质，这些物质也能非特异吸附在拉曼基底上，而产生严重的背景信号。特别是在检测临床样品时，由于生物样品的复杂性以及待检测样品浓度低，导致直接法检测所得到的SERS信号无法区分待检测分子的特异峰，而且检测重复性差。因此，后来研究人员更青睐间接法。

间接法一般依赖于增强拉曼检测探针（SERS probe）<sup>[35, 36]</sup>。增强拉曼探针从内到外一般包括四大部分：内部金属纳米核（用以增强拉曼信号分子）、能产生特异信号的信号分子、外周保护层（一般为二氧化硅或者高分子层）、生物识别分子（抗原抗体等）。其制备一般是将金或银纳米颗粒表面首先包裹一层可以产生特异信号的拉曼信号分子，再在其表面包裹一层保护层，之后在该保护层表面交联抗原抗体等生物识别分子，用以特异识别待检测的靶向分子。检测时，增强拉曼探针会由于结合待检测靶向分子，而被捕获在特定位置，这时通过检测拉曼探针信号分子的特定拉曼信号及强度即可间接检测靶向分子的浓度。拉曼探针的外周保护层可以有效地防止外界分子接触金属纳米表面从而大幅减少背景噪音信号，同时可提供官能团以方便地交联生物识别分子<sup>[37]</sup>。

其中使用增强拉曼探针最早的是Porter小组<sup>[38]</sup>，他们于 1999 年首次将金纳米颗粒与拉曼信号分子及抗体直接相作用形成拉曼检测探针，通过相应小鼠抗原与固定在基底上的羊抗小鼠IgG相连，进行“三明治”免疫检测，见图 1.1。

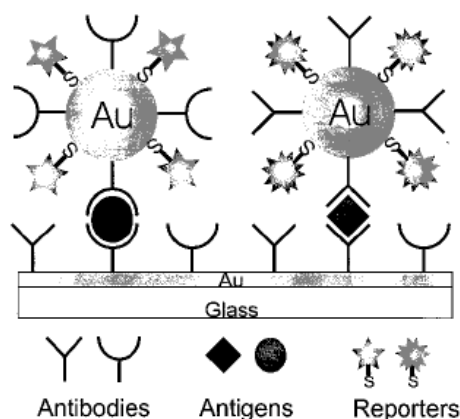


图 1.1 增强拉曼探针检测的夹心法免疫检测模型（引自 Porter 等）

Figure 1.1. Sandwich detection mode using a Au SERS probe

该方法的缺点是缺少对拉曼探针中金属核的保护，检测时，金属纳米非特异吸附检测环境其他分子而产生较大的噪音信号。为了防止纳米颗粒的污染，后期的增强拉曼探针被引入了一层保护层，如二氧化硅、高分子等。其中较为典型的是Yoon-Sik Lee等<sup>[39]</sup>人用二氧化硅保护的金增强拉曼探针检测细胞肿瘤。如图 1.2:

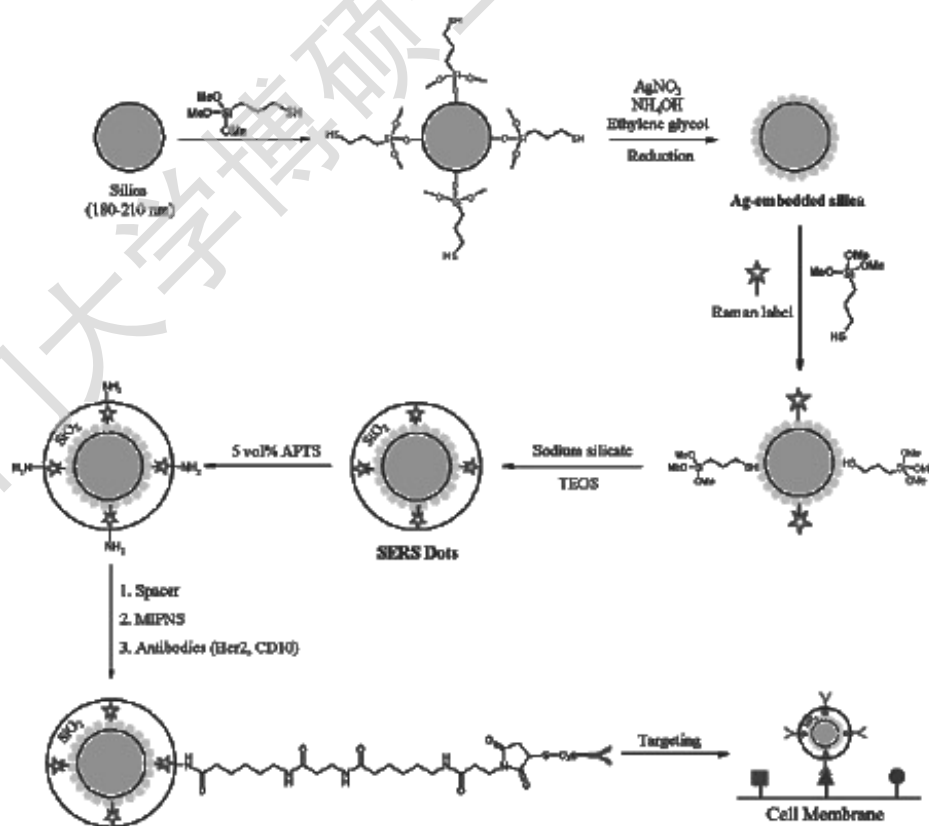


图 1.2 金纳米增强拉曼探针检测肿瘤细胞示意图（引自 Yoon-Sik Lee 等）

Figure 1.2 Detection of cellular cancer cell using a gold-based SERS probe

近年，以SERS探针作为间接检测的方法已被广泛应用于检测肿瘤细胞等体外试验（*in vitro*），甚至生物活体试验（*in vivo*）。其中具有代表性的是，Nie小组 2008 年在<Nature Nanotechnology>上发表的研究成果<sup>[40]</sup>，他们以金纳米颗粒为内核，聚乙二醇（PEG）为外层保护膜，组装了增强拉曼检测探针，并成功地应用于小鼠的活体检测，如图 1.3 所示：

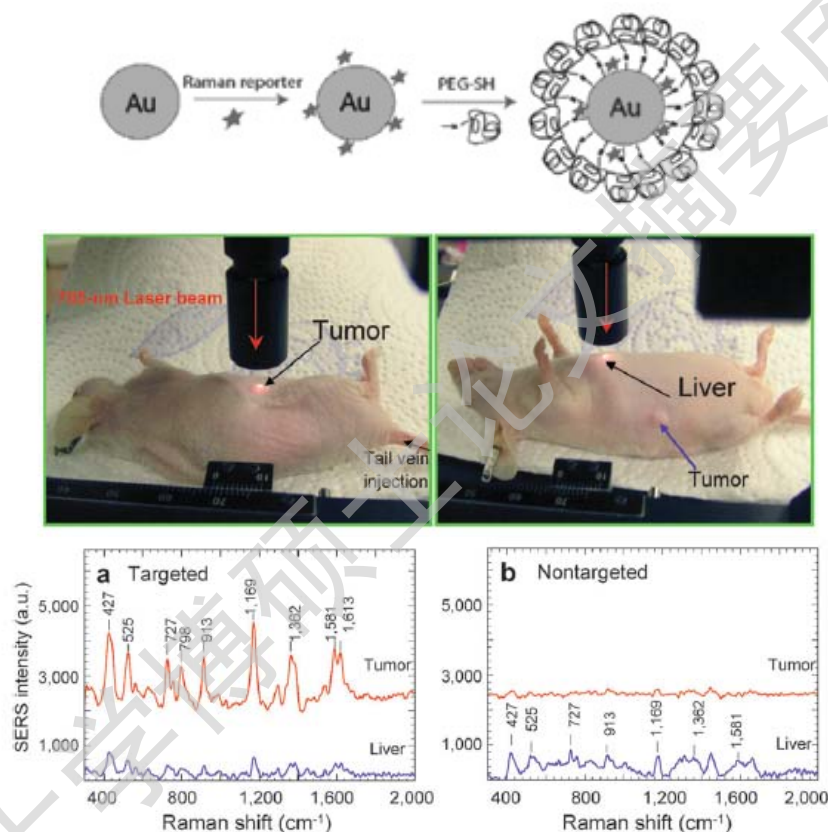


图 1.3 基于金纳米增强拉曼探针检测小鼠肿瘤示意图（引自 Nie 等）

Figure 1.3. In vivo detection of cancer tumor using a Au SERS probe (from Nie et. al.)

相比于传统的高灵敏荧光检测技术，利用增强拉曼探针的生物检测技术具有：检测灵敏度高（可达到  $10^6 - 10^{14}$  倍数的信号增强）；无光漂白（photobleaching）性质；多重检测性能好（拉曼光谱半峰宽仅为 1-2 波数，不同探针光谱不易重叠）等独特优势<sup>[39]</sup>。目前的研究热点主要集中在对增强拉曼探针本身的改进和设计，因为它们在很大程度上决定了检测的灵敏度和特异性。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库